

5,10-METHYLENTETRAHYDROFOLSÄURE-REDUKTASE
UND 5-METHYLTETRAHYDROFOLSÄURE:
L-HOMOZYSTEIN 5-METHYLTRANSFERASE IN ERYTHRO-
ZYTEN BEI GESUNDEN, PATIENTEN MIT MANGEL AN
DIESEN ENZYMEN UND BEI PATIENTEN
MIT KEARNS-SAYRE-SYNDROM

EDGAR BETZ

1986

*Luss
München*



Aus der Dr. von Haunerschen Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med H.-B. Hadorn

5,10-Methylenetetrahydrofolsäure-Reduktase und
5-Methyltetrahydrofolsäure: L-Homozystein
5-Methyltransferase in Erythrozyten bei
Gesunden, Patienten mit Mangel an diesen
Enzymen und bei Patienten mit Kearns-Sayre-
Syndrom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Edgar Betz

aus

Günzburg

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

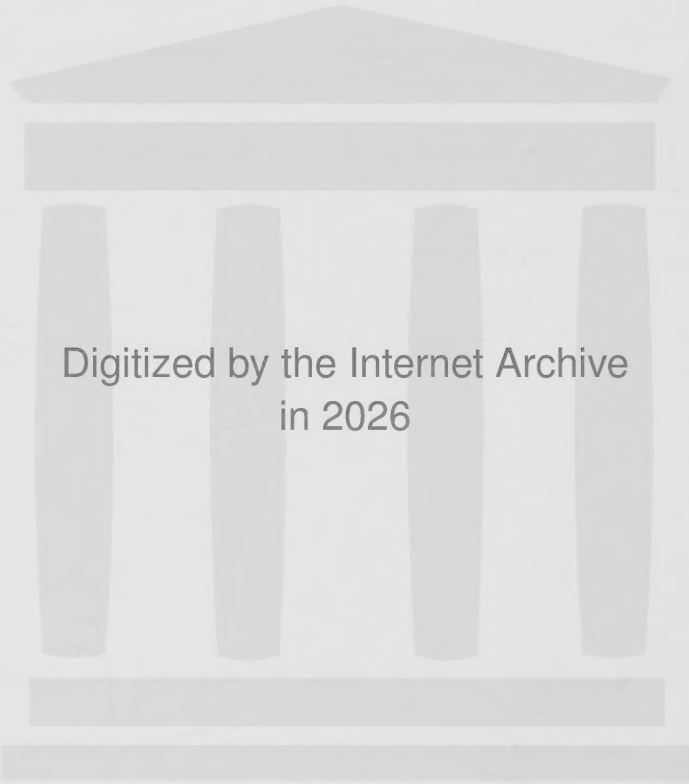
Berichterstatter: Prof. Dr. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 6. 1966

Besonders herzlich danke ich Frau Dr. Yoon Sook
Shin-Zoulek für ihre hilfreiche Unterstützung
bei der Erstellung meiner Dissertation.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung

	Seite
1. Der Folsäuremetabolismus	4
1.1 Die Rolle der Folsäure im Stoffwechsel	4
1.2 Die "Methyl-trap"-Hypothese	4
1.3 Die Funktion der Methyltetrahydrofolsäure	5
1.4 Abbildungen	6
2. Störungen des Folsäuremetabolismus	7
2.1 Die Bedeutung der Methylen-THF-Reduktase und Folgen ihrer eingeschränkten Funktion	7
2.2 Die Bedeutung der THF-Methyltransferase, sowie Ursachen und Folgen ihrer verminderten Aktivität	8
2.3 Das Kearns-Sayre-Syndrom	9
3. Die Zielsetzung der Arbeit	10

B. Durchführung der Arbeit

1. Materialien	11
1.1 Das Probenmaterial	11
1.2 Geräte	11
1.3 Chemikalien, radioaktive Substanzen und Medien	12
2. Herstellung der Versuchsreagenzien und -proben	13
3. Methoden	15
3.1 Hämoglobinbestimmung in den Erythrozyten nach der Hämoglobincyanidmethode	15
3.2 Messung der Aktivität des Enzyms Methylen-THF- Reduktase in Erythrozyten	16
3.3 Messung der Aktivität des Enzyms THF-Methyl- transferase in Erythrozyten	18
3.4 Statistische Auswertungsmethoden	19

C. Ergebnisse

	Seite
1. Die Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten	20
1.1 Ermittlung des Normbereichs der Enzymaktivität	20
1.2 Enzymaktivität in den Erythrozyten von Patienten	20
1.3 Die Stabilität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase	21
2. Die THF-Methyltransferase in Erythrozyten	21
2.1 Ermittlung des Normbereichs für die THF-Methyltransferase in Erythrozyten	21
2.2 Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase in den Erythrozyten der Patienten	21
2.3 Die Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase bei Modifikationen des Versuchsansatzes	22
3. Tabellen	23
4. Abbildungen	28

D. Diskussion der Ergebnisse

1. Der Normbereich	35
2. Modifikationen des Tests	36
3. Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom	38
4. Patient mit Cobalamin C-Stoffwechselstörung	40
5. Patient mit Methylen-THF-Reduktase-Mangel	41
6. Schlußfolgerung	42

E. Zusammenfassung

43

Literaturnachweis	46
-------------------	----

Lebenslauf	52
------------	----

ABKÜRZUNGEN

Cbl	=	Cobalamin
DHF	=	Dihydrofolsäure
DTT	=	DL-Dithiothreitol (Cleland's Reagent)
dUMP	=	Desoxyuridin-5-monophosphat
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	=	Flavin-adenin-dinucleotid
KSS	=	Kearns-Sayre-Syndrom
5,10-Methenyl-THF	=	5,10-Methenyltetrahydrofolsäure
5,10-Methylen-THF	=	5,10-Methylentetrahydrofolsäure
5- Methyl-THF	=	5-Methyltetrahydrofolsäure
Methylen-THF-Red.	=	MR = Methylen-THF-Reduktase
THF-Methyltransferase	=	5- Methyltetrahydrofolsäure:L-Homo- zystein 5-Methyltransferase
NADP ⁺	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
PtO ₂	=	Platinoxyd
SAM	=	S-Adenosyl-L-Methionin
THF	=	Tetrahydrofolsäure
V.a.	=	Verdacht auf
Vit B ₁₂	=	Vitamin B ₁₂

A. EINLEITUNG

1. Der Folsäuremetabolismus

1.1 Die Rolle der Folsäure im Stoffwechsel (8,16,21,22,25,43)

Die Folsäure, eine aus einem Pteridinkern, einer p-Aminobenzoesäure und L-Glutamatresten unterschiedlicher Länge bestehende Substanz (Abb. 1), nimmt in ihrer biologisch aktiven Form als Tetrahydrofolsäure entscheidenden Einfluß auf das Zellwachstum und die Zellteilung. Grund hierfür ist die Coenzymfunktion ihrer Derivate bei der Übertragung von 1-Kohlenstoffresten, die zur Biosynthese von Pyrimidinen und Purinen nötig sind. Daneben spielen die Folsäurederivate auch im Aminosäuren- und Phospholipidstoffwechsel (Cholinbiosynthese) eine wichtige Rolle. Aufgrund der Funktionen der Folate läßt sich erklären, daß besonders schnell proliferierende Gewebe, wie z.B. das Knochenmark, bei gravierenden Störungen des Folsäurestoffwechsels stark betroffen sind. So kommt es z.B. beim Menschen zu Veränderungen des Blutbilds, die als makrozytäre hyperchrome Anämie imponieren.

1.2 Die "Methyl-trap"-Hypothese (3,4,22,43)

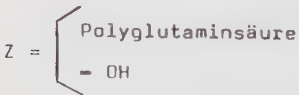
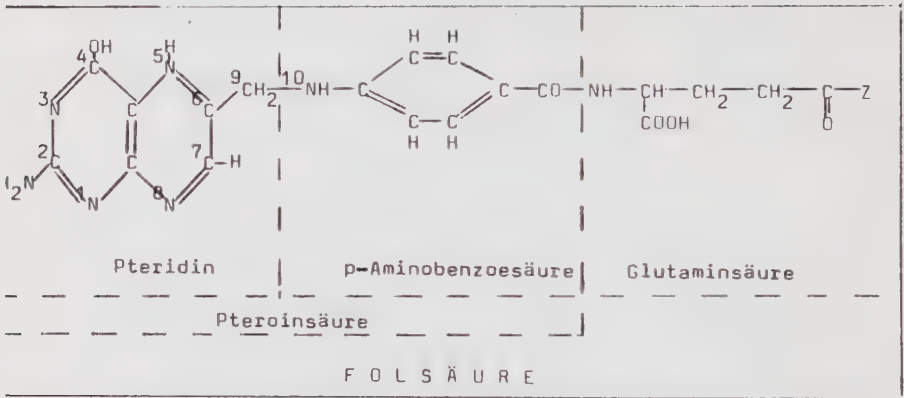
Neben den Folaten kommt dem Cobalamin bei der Entwicklung einer Anämie vom megaloblastären Typ eine große Bedeutung zu. Dies findet in der "Folate-trap"-Hypothese seinen Ausdruck. Sie geht davon aus, daß in Anwesenheit des Cofaktors Cobalamin die Synthese von Tetrahydrofolsäure aus Methyltetrahydrofolsäure unter gleichzeitiger Bildung von Methionin aus Homozystein durch das Enzym THF-Methyltransferase abläuft. Da die Folate in vielen Organen des menschlichen Körpers zu einem großen Teil als Methyltetrahydrofolsäure vorliegen und die Reaktion von 5,10-Methylenetetrahydrofolsäure zu 5-Methyltetrahydrofolsäure in vivo praktisch nicht reversibel ist, kommt es zu einem

Aufstau der Methyltetrahydrofolsäure im Stoffwechsel. Diese Blockierung im Stoffwechsel bezeichnet man als "Methyl-trap". Dadurch wird die für die Thymidylatsynthese notwendige 5,10-Methylen-THF nur ungenügend bereitgestellt (Abb. 2).

1.3 Die Funktion der Methyltetrahydrofolsäure (41,43)

Bei der Methyl-THF handelt es sich um eine biologisch inaktive Speicherform, die erst nach Abspaltung der Methylgruppe und Überführung in eine höhere Oxydationsstufe zur Bildung von Purinen, Pyrimidinen etc. herangezogen werden kann. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß ein Großteil des Körperpools der Folate als Methyl-THF vorliegt. So ließ sich in der menschlichen Leber, in den menschlichen Erythrozyten (etwa 95 %), im Gehirn und im Serum ein hoher Anteil an dieser Substanz nachweisen. Dabei überwiegen in den menschlichen Erythrozyten Polyglutamatformen, vor allem Penta- und Hexaglutamate, während z.B. im Serum hauptsächlich Monoglutamate vorliegen.

1.4 Abbildungen



DERIVATE:

1. Dihydrofolsäure: Hydrierung von C₇ und N₈
2. Tetrahydrofolsäure: Hydrierung von C₇, N₈, N₅ und C₆
3. 5-Methyltetrahydrofolsäure: - Hydrierung von N₅, C₆, C₇ und N₈
 - -CH₃ an N₅ (Methylierung von N₅)
4. 5,10-Methylentetrahydrofolsäure: - Hydrierung von N₅, C₆, C₇, N₈
 - -CH₂- zwischen N₅ und N₁₀

Abb. 1: Die Struktur der Folsäure und ihrer Derivate

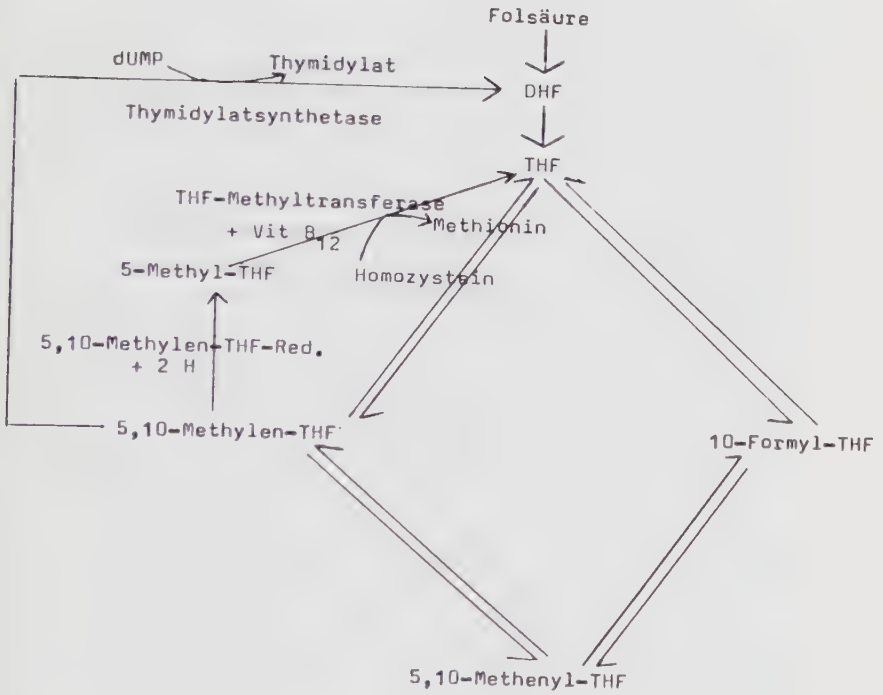


Abb. 2: Der Folsäuremetabolismus



2. Störungen des Folsäuremetabolismus

2.1 Bedeutung der Methylen-THF-Reduktase und Folgen ihrer eingeschränkten Funktion

Die Methylen-THF-Reduktase, ein FAD-abhängiges Enzym, katalysiert die Umwandlung des Diastereoisomers 1,4,5,10-Methylen-THF zu Methyl-THF (18). Dabei übernimmt NADPH die Rolle des Elektronendonators. Die Reaktion, die in vivo praktisch irreversibel ist, läuft wie die meisten Schritte des Folsäurestoffwechsels im Zytosol ab. Eine allosterische Inhibierung des Enzyms erfolgt durch S-Adenosyl-L-Methionin, die partiell durch S-Adenosyl-Homozystein wieder aufgehoben werden kann (20,37).

Der Mangel bzw. das Fehlen von Methylen-THF-Reduktase, was bisher in 14 Fällen beschrieben worden ist, führt zu einer sehr unterschiedlichen Symptomatik, die in ihrer Schwere vom Grad der Einschränkung der Enzymfunktion abhängig ist (38). Es lassen sich gelegentlich neurologische Störungen, wie Spasmen und Krampfanfälle (32,48), erhöhter intrakranieller Druck (2), sowie geistige und psychomotorische Retardierungen nachweisen. Schizophrenieähnliche Bilder, die bei diesem Enzymmangel auftreten können, gehen eventuell auf die fehlende Methylierung von Dopamin im Gehirn aufgrund des erniedrigten Methyl-THF-Spiegels zurück (14,36). Dieser Substratmangel ist auch für die erhöhte renale Exkretion und die erhöhte Serumkonzentration von Homozystein verantwortlich, da die Methylierung von Homozystein zu Methionin vermindert ist (35,43). Morphologisch ergeben sich daraus Gefäßveränderungen, die sich in einer Intimahyperplasie und in einer erhöhten Thromboseneigung äußern (15).

2.2 Die Bedeutung der THF-Methyltransferase, sowie Ursachen und Folgen ihrer verminderten Aktivität

Mit Hilfe des Enzyms THF-Methyltransferase und seiner prosthetischen Gruppe, dem Vit B₁₂, wird Homozystein zu Methionin methyliert unter gleichzeitiger Umwandlung von Methyl-THF zu THF. Dabei wird zunächst unter der Mitwirkung von SAM die Methylgruppe auf das voll reduzierte Cob-I-alamine übertragen und ein Methyl-Vit B₁₂-Intermediat gebildet. Dann erst kann die Methylierung des Homozysteins erfolgen (45,47). Das erklärt, warum diese irreversible Reaktion nur in Anwesenheit katalytischer Mengen von SAM und Vit B₁₂, das auch die Folsäureaufnahme in die Zelle beeinflussen soll (4), ablaufen kann (7). Störungen im Cobalaminstoffwechsel oder ein Mangel an THF-Methyltransferase führen zu einer verminderten Bereitstellung von THF für die Purin-, Pyrimidin-, Cholinbiosynthese etc.. In der Mehrzahl der bisher bekannten Fälle handelt es sich dabei um Störungen am Beginn des intrazellulären Cobalaminmetabolismus, die auf Neumutationen im genetischen Erbmaterial zurückgehen sollen (43). Dabei unterscheidet man die Cbl C-Form mit ihrer schwereren Symptomatik von der Cbl D-Form mit ihrer leichteren Symptomatik (43). Das Krankheitsbild wird durch Gedeihstörungen, Entwicklungsrückstände, Krampfanfälle, eine subakute Degeneration des Rückenmarks, sowie hämatologische Veränderungen, wie megaloblastische Anämie, Hypersegmentation der Neutrophilenkerne und hämolytische Krisen, geprägt (9,28,43). Gleichzeitig liegt außer einer Homozystinurie und -ämie, einer Hypomethioninämie (23,33) auch eine erhöhte renale Exkretion von Methylmalonylsäure vor (5,43), da die Methylmalonyl-Co A-Mutase Adenosylcobalamin als Cofaktor benötigt. Die Serumkonzentration an Vit B₁₂ liegt im Normbereich, während der Cobalamingehalt der Leber, der Niere und der von Fibroblastenkulturen stark erniedrigt ist (5,11,24).

Ein Mangel an THF-Methyltransferase als Ursache für eine verminderte Aktivität des Enzyms konnte bisher äußerst selten nach-

gewiesen werden. Die betroffenen Patienten zeigten ähnliche Symptome wie die Patienten mit Cobalaminstoffwechselstörungen. Eine Hepatosplenomegalie konnte zusätzlich beobachtet werden (43).

2.3 Das Kearns-Sayre-Syndrom

Beim Kearns-Sayre-Syndrom handelt es sich um eine nicht vererb-
bare Erkrankung, die durch die drei Symptome chronisch progres-
sive externe Ophthalmopathie, Pigmentdegeneration der Retina und
Reizleitungsstörungen des Herzens charakterisiert ist. Zerebel-
läre Ataxie, Krampfanfälle und fortschreitende Demenz treten
häufig zusätzlich hinzu. Morphologisch lassen sich Mitochon-
drienanomalien und "ragged red fibers" (= Muskelfasern mit ver-
stärkter Granulierung und basophil gefärbten Randsäumen, sowie
vergrößerter retikulärer Struktur in den oxydativen Reaktionen)
nachweisen (6,40). In einigen Fällen wurde auch ein erniedrigter
Folsäurespiegel des Liquors festgestellt (1,10,13). Daraus ergibt
sich der Verdacht einer Störung des Folsäuremetabolismus im Rah-
men dieses Syndroms.

3. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Möglichkeit einer Vereinfachung der
Messung der Aktivität der Methylen-THF-Reduktase und der THF-Me-
thyltransferase untersucht werden. Zu diesem Zweck sollen die
Enzymaktivitäten der menschlichen Erythrozyten ermittelt wer-
den und daraus die Normbereiche bestimmt werden, die den Pa-
tientenwerten gegenübergestellt werden. Da es sich bei den Pa-
tienten u.a. um eine Patientin mit V.a. Methylen-THF-Reduktase-
Mangel und einen Patienten mit V.a. eine Cobalamin C-Stoffwech-
selstörung handelt, bei denen Änderungen der Enzymaktivitäten
im Test vorliegen müßten, lassen sich aus den Ergebnissen
Rückschlüsse auf die Zuverlässigkeit und Validität des Tests
ziehen.

B. DURCHFÜHRUNG DER ARBEIT

1. Materialien

1.1 Probenmaterial

Als Probenmaterial stand heparinisiertes Blut von 20 Kontrollpersonen im Alter zwischen 3 Monaten und 62 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 20 Jahren, sowie von 5 Patienten zur Verfügung. Bei den Patienten handelt es sich um ein dreijähriges Mädchen mit Verdacht auf Methylen-THF-Reduktase-Mangel, einen zweijährigen Jungen mit Verdacht auf eine Cobalamin C-Stoffwechselstörung und zwei Frauen im Alter von 49 und 70 Jahren, sowie einen 25jährigen Mann mit Verdacht auf ein Kearns-Sayre-Syndrom.

1.2 Geräte

Eppendorf-Photometer M 167671

große Ultrazentrifuge der Fa. Hettich

kleine Ultrazentrifuge der Fa. Hettich

Heizblock der Fa. Liebisch 37°C und 95°C

Gefrierschrank der Fa. Bosch, Temp. -20°C

Säulenständer der Fa. Bio-Rad. Laboratories

Einmalküvetten, Einmalreagenzgläser

Eismaschine

Counter zum Messen der Betastrahlung von ^3H und ^{14}C

Zählgefäße

Eppendorfhütchen, Pipetten

Wasserstoffflasche und Plastikschauch mit einem Durchmesser von 0,5 cm

pH-Meter

Rechergläser

Hb A₁-Röhrchen mit einem Durchmesser von 0,5 cm

1.3 Chemikalien, radioaktive Substanzen und Medien

- 5-(¹⁴C)-Methyl-tetrahydrofolic acid, barium salt, Fa. Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
- DL-5-Methyl-tetrahydrofolic acid, barium salt, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- DL-Homocystein, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- Flavin Adenine Dinucleotide, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- S-Adenosyl-L-Methionine, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- Menadione, Sodium bisulfite salt, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- L-Methionine, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- DL-Dithiotreitol (Cleland's Reagent), Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- Ethylenediaminetetraacetic acid, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen
- Vit B₁₂ (Cyanocobalamin), Fa. Merck, Darmstadt
- Dimedon, Fa. Merck, Darmstadt
- Platin-(IV)-Oxid-Hydrat 80 % Pt, Fa. Merck, Darmstadt
- Dikaliumhydrogenphosphat, K₂HPO₄, Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH₂PO₄, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxyd-Plätzchen, NaOH, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumacetat, CH₃COONa, Fa. Merck, Darmstadt
- Toluol, Fa. Merck, Darmstadt
- Essigsäure 96 % zur Analyse, CH₃COOH, Fa. Merck, Darmstadt
- Quickszint, Zinsser Analytic, München
- Kaliumacetat, CH₃COOK, Fa. Merck, Darmstadt
- Dowex-2-Chloride, dry mesh 100 - 200, Fa. Sigma Chem. Com., Taufkirchen

2. Herstellung von Versuchsreagenzien und -proben

- 17 mM EDTA

Lösen von 63,3 mg EDTA in 10 ml H_2O_{bidest}

- 0,1 M Natriumascorbatlösung, pH 6,35

0,881 g L-(+)-Ascorbinsäure werden in 50 ml H_2O_{bidest} gelöst. Danach wird tropfenweise 0,5N NaOH hinzugegeben, bis ein pH von 6,35 erreicht ist (Kontrolle durch ein pH-Meter).

- 0,2 M DTT

Lösen von 308,6 mg DTT in 10 ml H_2O_{bidest}

- 1,7 mM FAD

Lösen von 15,5 mg FAD in 10 ml H_2O_{bidest}

- 5 mM Homozystein

Lösen von 13,2 mg Homozystein in 20 ml H_2O_{bidest}

- 2,4 mM SAM

Lösen von 15,8 mg S-Adenosyl-L-Methionin in 10 ml H_2O_{bidest}

- 1,2 mM Vit B₁₂

Lösen von 16,3 mg Vit B₁₂ (Cyanocobalamin) in 10 ml H_2O_{bidest}

- 2 mM Methyl-THF

Lösen von 25 mg Methyl-THF in 25 ml Natriumascorbatlösung, pH 6,35

- 5 mM Menadion

Lösen von 43 mg Menadion in 50 ml H_2O_{bidest}

- 1 M Kaliumacetatpuffer, pH 4,5, mit 3 mg Dimedon/ml

Auffüllen von 5,9 ml konzentrierter Essigsäure auf 100 ml mit H_2O_{bidest}

Lösen von 9,81 g Kaliumacetat in 100 ml H_2O_{bidest}

Die 1 M Essigsäure und die 1 M Kaliumacetatlösung werden dann in einem derartigen Verhältnis gemischt, daß sich ein pH von 4,5 ergibt (Kontrolle durch pH-Meter).

- 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,3 (bzw. 7,4),

Um eine 1 M K_2HPO_4 -Lösung zu erhalten, verrührt man 13,6 g K_2HPO_4 in 100 ml H_2O_{bidest} .

Um eine 1 M KH_2PO_4 -Lösung zu erhalten, gibt man 11,4 g KH_2PO_4 in 50 ml H_2O_{bidest} .

Die Lösungen werden in einem derartigen Verhältnis gemischt, daß sich ein pH von 6,3 (bzw. 7,4) ergibt (Kontrolle durch pH-Meter).

- Dowex-Chlorid

50 g Dowex-2-Chlorid-Pulver wird mit 2 l H_2O_{bidest} verrührt. Dann wartet man, bis die gequollene Substanz sedimentiert ist, und dekantiert den Überstand, um Verunreinigungen zu entfernen. Dieser Vorgang wird 5 bis 6mal wiederholt. Die Dowex wird dann, mit H_2O_{bidest} versetzt, in einer Flasche im Kühlschrank aufbewahrt.

- Erythrozytenkonzentrat

Das heparinisierte Blut wird sofort nach Erhalt 10 Minuten lang zentrifugiert bei 1500 x g. Der Überstand wird dekantiert und die Erythrozyten nach dreimaligem Waschen mit 0,9 % NaCl-Lösung im Gefrierschrank bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3. Methoden

3.1 Hämoglobinbestimmung in den Erythrozyten nach der Hämoglobincyanidmethode

- Reagenzien:

Transformationslösung: Kal. cyanat. 0,05 g

Kal. ferricyanat. 0,2 g

Natriumbicarbonat 1,0 g

Aqua dest. ad 1000 ml

- Durchführung des Tests:

20 µl der Proben werden mit 5 ml Transformationslösung versetzt und nach kräftigem Umrühren 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Extinktion im Photometer bei Filter Hg 546 nm in Küvetten von 1 cm Schichtdicke gegen reine Transformationslösung gemessen.

- Berechnung des Hämoglobingehalts:

$$E_{546 \text{ nm}} \times 36,8 = \text{g Hb/100 ml}$$

3.2 Messung der Aktivität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten

Die Messung der Aktivität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase erfolgte nach der Methode von Kutzbach und Stokstad (20), die in einigen Punkten modifiziert wurde.

- Prinzip des Tests:

Die radioaktiv markierte Methyl-THF wird mit Hilfe von Menadion als Elektronenakzeptor durch das Enzym Menadion-reduktase, die mit der Methylen-THF-Reduktase identisch ist, in Formaldehyd und THF gespalten (17). Die Konzentration des so entstandenen, radioaktiv markierten Formaldehyds wird bestimmt und daraus die Aktivität der Methylen-THF-Reduktase als nmol Substratumsatz pro Stunde und pro g Hb berechnet. Diese Reaktion, die FAD als Co-enzym benötigt (12), läuft in vivo äußerst langsam ab.

- Durchführung des Tests:

Jeweils 10 μ l 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,3, 0,1 M Natriumascorbatlösung, pH 6,35, 17 mM EDTA-Lösung, 1,7 mM FAD-Lösung, 0,2 mM Methyl-THF-Lösung (2 mM Methyl-THF-Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ im Verhältnis 1 : 10 verdünnt) und (^{14}C)-Methyl-THF-Lösung (10 $\mu\text{Ci/ml}$) werden in ein sich im Eisbad befindliches Eppendorfhütchen pipettiert. 50 μ l Erythrozytenlösung (aufgetautes Erythrozytenkonzentrat mit dreifacher Menge an $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ versetzt) wird hinzugegeben und das Reaktionsgemisch kurz gerüttelt. Zum Starten der Reaktion fügt man 15 μ l 5 mM Menadionlösung hinzu und inkubiert das Gemisch eine Stunde lang bei 37°C in geschlossenen Eppendorfhütchen im Heizblock. Dann stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 60 μ l 1 M Kaliumacetatlösung, pH 4,5, mit 3 mg Dimedon/ml und stellt die Eppendorfhütchen 5 Minuten lang in

einen 95°C heißen Heizblock. Nach kurzem Abkühlen im Eisbad fügt man 600 µl Toluol hinzu, rüttelt das Ganze, bis eine vollkommene Suspension vorliegt, und zentrifugiert diese anschließend 30 Sekunden lang. Dadurch erhält man zwei Phasen, eine Toluol- und eine wässrige Phase, wobei sich das Produkt aus Formaldehyd und Dimedon in der Toluolphase befindet. 300 µl dieser Toluolphase werden dann in ein Zählgefäß pipettiert und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Anschließend mißt man die Aktivität des Kondensats aus Formaldehyd und Dimedon im Counter.

Zur Bestimmung der Leerwerte wurde eine Inaktivierung der Methylen-THF-Reduktase durch fünfminütiges Erhitzen der Erythrozyten auf 95°C im Heizblock vor dem Starten der Reaktion mit Menadion durchgeführt.

- Modifikationen bei der Durchführung des Tests zur Bestimmung der Stabilität der Methylen-THF-Reduktase:

Zunächst wird aus dem heparinisierten Blut von zwei Probanden ein frisches Erythrozytenkonzentrat hergestellt und sofort für den ersten Teil des Tests herangezogen. Ein Teil davon wird eingefroren, aufgetaut (30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen lassen) und dann im zweiten Teil des Versuchs verwendet. Nach dem Auftauen nochmals eingefrorenes Erythrozytenkonzentrat ist das Probenmaterial für den dritten Teil des Tests. Das übrige Vorgehen entspricht der zuvor beschriebenen Durchführung des Versuchs zur Bestimmung der Aktivität der Methylen-THF-Reduktase.

- Berechnung der Aktivität der Methylen-THF-Reduktase:

$$\Delta \text{cpm} = \text{cpm der Probe} - \text{cpm des Leerwerts}$$

$$\text{Konz. der Methyl-THF} \times \text{ml Reaktionsgemisch} \times \frac{100}{\text{g Hb} \times \text{Menge Eryls.}} \times$$

$$\times \frac{1}{\text{Zeit in h}} \times \text{cpm d. zugefügten Menge an } (^{14}\text{C})\text{-Methyl-THF} \times 2 =$$

$$= \text{nmol Substratumsatz / g Hb/h}$$

3.3 Messung der Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase in den Erythrozyten

Die Messung der Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase erfolgte nach der Methode von Taylor und Weissbach (45), an der einige Modifikationen vorgenommen wurden.

- Prinzip des Tests:

Die THF-Methyltransferase katalysiert in Anwesenheit ihrer Cofaktoren SAM und Vit B₁₂ die Umwandlung von Methyl-THF in THF unter gleichzeitiger Bildung von Methionin aus Homozystein. Verwendet man nun eine am C-Atom der Methylgruppe radioaktiv markierte Methyl-THF, so erhält man im Rahmen der Transmethylierung entstandenes radioaktives Methionin. Dies kann mit Hilfe einer mit Dowex-2-Chlorid gefüllten Säule nachgewiesen werden, die radioaktiv markierte Methyl-THF zurückhält, während sie radioaktives Methionin passieren läßt.

- Durchführung des Tests:

Jeweils 20 µl 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 5 mM Homozystein, 2,4 mM SAM, 2 mM Methyl-THF, (¹⁴C)-Methyl-THF (10 µCi/ml), 0,2 M DTT und 1,2 mM Vit B₁₂ werden in ein Eppendorfhütchen pipettiert und 75 µl Erythrozytenlösung (aufgetautes Erythrozytenkonzentrat mit dreifacher Menge an H₂O_{bide}st versetzt) hinzugefügt. Unter ständiger H₂-Belüftung erfolgt dann im 37°C warmen Heizblock die Zugabe von 20 µl FADH₂, das durch Lösen von 1,6 mg FAD und 3 mg des Katalysators PtO₂ in 500 µl H₂O_{bide}st und fünfminütiger H₂-Belüftung hergestellt worden ist. Die Eppendorfhütchen werden verschlossen und jede halbe Stunde während des vierstündigen Versuchs mit Wasserstoff belüftet. Nach dieser Zeit wird das Gemisch 5 Minuten lang auf 95°C erhitzt, anschließend im Eisbad abgekühlt und dann 3 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und auf die 2 cm hoch mit Dowex-2-Chlorid gefüllte Säule (Durchmesser: 0,5 cm) gege-

ben, aus der mit 2 ml H_2O_{bidest} das radioaktive Methionin eluiert wird. Das in Zählgefäßen aufgefangene Eluat wird mit 18 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt, und anschließend werden die cpm im Counter gemessen.

Die Leerwerte bestimmt man, indem man die THF-Methyltransferase in den Erythrozyten vor Versuchsbeginn durch fünfminütiges Erhitzen auf $95^{\circ}C$ im Heizblock inaktiviert.

- Modifikationen bei der Durchführung des Tests:

In 7 Fällen wurde der Test ohne SAM, in 7 Fällen ohne Vit B_{12} und in drei Fällen ohne FAD durchgeführt. Die weggelassenen Substanzen wurden durch H_2O_{bidest} ersetzt. Fünfmal wurde anstatt Vit B_{12} (Cyanocobalamin) Methylcobalamin in den Versuchen verwendet.

Bei der Untersuchung der Stabilität des Enzyms THF-Methyltransferase in den Erythrozyten wurden die Erythrozyten wie bei der Untersuchung der Stabilität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase behandelt. Das übrige Vorgehen entsprach gänzlich dem unter dem Punkt "Durchführung des Tests" erläuterten Verfahren.

- Berechnung der Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase:

$\Delta cpm = cpm \text{ der Probe} - cpm \text{ des Leerwerts}$

$$\begin{aligned} & \text{Konz. der Methyl-THF} \times \text{ml Reaktionsgemisch} \times \frac{100}{g \text{ Hb} \times \text{Menge Erylg.}} \times \\ & \times \frac{1}{\text{Zeit in h}} \times \frac{\Delta cpm}{cpm \text{ der zugefügten Menge an } (14C)\text{-Methyl-THF}} = \\ & = \text{nmol gebildetes Methionin/g Hb/h} \end{aligned}$$

3.4 Statistische Auswertungsmethode

Die Standardabweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Der Mittelwert wurde folgendermaßen berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

C. ERGEBNISSE

1. Die Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten

1.1 Ermittlung des Normbereichs der Enzymaktivität

Bei den 20 Kontrollpersonen im Alter zwischen 3 Monaten und 62 Jahren wurde die mittlere Aktivität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten mit 3,9 nmol Substratumsatz/h/g Hb bestimmt. Die Standardabweichung beträgt $\pm 1,4$ (Tab. 1, Abb. 3), und der Normbereich umfaßt Werte zwischen 1,6 und 8,0 nmol/h/g Hb. Dabei läßt sich keine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Alter der Probanden nach dem 14. Lebensjahr nachweisen, wie aus der gleich großen Streubreite der Werte in diesen Altersgruppen zu ersehen ist (Abb. 5).

1.2 Enzymaktivität in den Erythrozyten von Patienten

Während sich in den Erythrozyten der dreijährigen Patientin mit Verdacht auf Methylen-THF-Reduktase-Mangel keinerlei Enzymaktivität nachweisen ließ, wurde in den Erythrozyten des zweijährigen Patienten mit Verdacht auf eine Cobalamin C-Stoffwechselstörung eine Enzymaktivität von 1,6 nmol Substratumsatz/h/g Hb festgestellt. Dieselbe Aktivität ließ sich in den Erythrozyten der beiden Frauen mit Kearns-Sayre-Syndrom bestimmen, während die in den Erythrozyten des jungen Mannes mit Kearns-Sayre-Syndrom den etwas höheren Wert von 1,9 nmol Substratumsatz/h/g Hb erreichte. Damit bewegen sich die Werte für den Patienten mit der Cbl C-Stoffwechselstörung und die Patienten mit dem KSS deutlich unterhalb des Mittelwertes am Rande des unteren Normbereichs, ohne jedoch wie bei der Patientin mit Methylen-THF-Reduktase-Mangel im pathologischen Bereich angesiedelt zu sein (Tab. 1, Abb. 3).

1.3 Die Stabilität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase

Wie sich aus der Tabelle 2 und der Abb. 4 ersehen läßt, spielt es keine Rolle, ob für die Tests frisch zubereitete Erythrozytenkonzentrate oder bei -20°C eingefrorene genommen werden. Die Aktivität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase unterscheidet sich in beiden Fällen nur geringgradig. Lediglich bei der Verwendung von Erythrozytenkonzentraten, die nach dem Auftauen nochmals eingefroren wurden, zeigte sich in einem Fall eine Aktivitätsminderung um annähernd 40 %, während im anderen Fall keinerlei Änderung auftrat.

2. Die THF-Methyltransferase in Erythrozyten

2.1 Ermittlung des Normbereichs für die THF-Methyltransferase in Erythrozyten

Bei den 20 Kontrollpersonen im Alter von 3 Monaten bis zu 62 Jahren liegen die Durchschnittswerte für die Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase bei $6,5 \text{ nmol Substratumsatz/h/g Hb}$. Die einfache Standardabweichung beträgt $\pm 3,0 \text{ nmol/h/g Hb}$, und der Normbereich umfaßt Werte zwischen $3,4$ und $14,0 \text{ nmol/h/g Hb}$ (Tab. 3, Abb. 6). Diese zeigen keine Abhängigkeit vom Alter der Probanden nach dem 14. Lebensjahr, wie sich aus Abb. 9 ersehen läßt.

2.2 Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase in den Erythrozyten der Patienten

Bei den 3 Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom wurde die Enzymaktivität mit $5,0$, $5,0$ bzw. $4,9 \text{ nmol Substratumsatz/h/g Hb}$ bestimmt, bei der dreijährigen Patientin mit Methylen-THF-Reduktase-Mangel mit $6,0 \text{ nmol/h/g Hb}$. Diese Werte liegen im Normbereich und sind nur geringfügig niedriger als die durchschnittlichen Enzymaktivitäten in den Erythrozyten der Kontrollpersonen (Tab. 3, Abb. 6). Lediglich die Aktivität der THF-Methyl-

transferase bei dem zweijährigen Patienten mit einer Cobalamin C-Stoffwechselstörung bewegte sich mit 1,6 nmol Substratumsatz/h/g Hb deutlich unterhalb der Grenze des Normbereichs (Tab. 3, Abb. 6). Bei der Verwendung von Methylcobalamin anstatt Vit B₁₂ im Versuchsansatz ließ sich eine grenzwertige Aktivität von 3,4 nmol Substratumsatz/h/g Hb nachweisen, während bei den übrigen fünf Kontrollpersonen die Aktivität der THF-Methyltransferase geringfügig um 0,8 nmol/h/g Hb von 4,8 nmol/h/g Hb auf 4,0 nmol/h/g Hb sank (Tab. 5, Abb. 7).

2.3 Die Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase bei Modifikationen des Versuchsansatzes

In den sieben Fällen, in denen im Versuchsansatz Vit B₁₂ durch H₂O_{bide}st ersetzt wurde, ließ sich keinerlei Enzymaktivität mehr nachweisen. Wurde dagegen anstatt SAM H₂O_{bide}st zugegeben (ebenfalls sieben Kontrollen), wurden Werte von $1,7 \pm 0,7$ nmol Substratumsatz/h/g Hb bestimmt. Damit liegt hier eine Erniedrigung der Enzymaktivität um 75 % vor. Beim Ersatz von FADH₂ durch H₂O_{bide}st zeigten sich noch signifikantere Unterschiede: Die Enzymaktivität betrug nur noch 0,9 nmol/h/g Hb, was einen durchschnittlichen Aktivitätsverlust von 86 % bedeutet (Tab. 4).

Bei der Untersuchung der Stabilität des Enzyms THF-Methyltransferase stellte sich heraus, daß die Werte bei frischen, eingefrorenen und nach dem Auftauen nochmals eingefrorenen Erythrozytenkonzentraten keine großen Schwankungen aufwiesen (maximal 15 %) (Tab. 6, Abb. 8).

Proben	Alter in Jahren	Aktivität des Enzyms in nmol Substratumsatz/h/g H
Kontrollen n = 20	20 im Durchschnitt	$\bar{x} = 3,9 \pm 1,4_a$ Normbereich: 1,6 bis 8,0
L. D. V. a. KSS	20	1,6
E. R. V. a. KSS	49	1,6
R. M. V. a. KSS	25	1,9
C. M. V. a. MR-Mangel	3	0
H. V. a. Cbl C-Stoff- wechselstörung	2	1,6

a = einfache Standardabweichung s

Tabelle 1: Die Aktivität der Methylen-THF-Reduktase

	Aktivität der Probe 1 in nmol/h/g Hb	Aktivitätsverlust in %	Aktivität der Probe 2 in nmol/h/g Hb	Aktivitätsverlust in %
Teil 1	4,6	0	4,6	0
Teil 2	5,1	0	4,4	0
Teil 3	5,0	0	2,7	40

Teil 1: Verwendung frisch zubereiteter Erythrozyten

Teil 2: Verwendung eines einen Tag lang bei -20°C eingefrorenen Erythrozytenkonzentrats

Teil 3: Verwendung eines Erythrozytenkonzentrats, das einen Tag lang bei -20°C eingefroren war, dann 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend erneut bei -20°C eingefroren wurde

Tabelle 2: Messung der Stabilität der Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten

Proben	Alter in Jahren	Aktivität des Enzyms in nmol Substratumsatz/h/g Hb
Kontrollen n = 20	20 im Durchschnitt	$\bar{x} = 6,5 \pm 3,0_a$ Normbereich: 3,4 bis 14,0
L. D. V. a. KSS	70	5,0
E. R. V. a. KSS	49	5,0
R. M. V. a. KSS	25	4,9
C. M. V. a. MR-Mangel	3	6,0
H. V. a. Cbl C-Stoff- wechselstörung	2	1,6

a = einfache Standardabweichung s

Tabelle 3: Die Aktivität der THF-Methyltransferase in Erythrozyten

Änderung	Anzahl der Proben	Alter im Durchschnitt	Aktivität in nmol/h/g Hb	Aktivitätsverlust in %
keine	n = 20	20	$6,5 \pm 3,0_a$	0
ohne Vit B ₁₂	n = 7	13	0	100
ohne SAM	n = 7	13	$1,7 \pm 0,7_a$	75
ohne FADH ₂	n = 3	22	0,9	86

a = einfache Standardabweichung s

Tabelle 4: Bestimmung der Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase bei Änderungen der Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

Proben	Alter im Durchschnitt	Aktivität in nmol/h/g Hb	
		Test 1	Test 2
Kontrollen n = 5	32	$4,8 \pm 1,0_a$	$4,0 \pm 0,7_a$
H. V. a. Cbl C-Stoffwechselstörung	2	1,6	3,4

a = einfache Standardabweichung s

Test 1: keine Änderung der Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

Test 2: Verwendung von Methylcobalamin anstatt Vit B₁₂ im Reaktionsgemisch

Tabelle 5: Bestimmung der Aktivität der THF-Methyltransferase bei Verwendung von Methylcobalamin anstatt Vit B₁₂ im Reaktionsgemisch

	Aktivität der Probe 1 in nmol/h/g Hb	Aktivitätsverlust in %	Aktivität der Probe 2 in nmol/h/g Hb	Aktivitätsverlust in %
Teil 1	5,2	0	6,0	0
Teil 2	4,4	15	5,2	13
Teil 3	5,2	0	5,9	0

Teil 1: Verwendung frisch zubereiteter Erythrozyten

Teil 2: Verwendung eines einen Tag lang bei -20°C eingefrorenen Erythrozytenkonzentrats

Teil 3: Verwendung eines Erythrozytenkonzentrats, das einen Tag lang bei -20°C eingefroren war, dann 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend erneut bei -20°C eingefroren wurde

Tabelle 6: Messung der Stabilität der THF-Methyltransferase in Erythrozyten

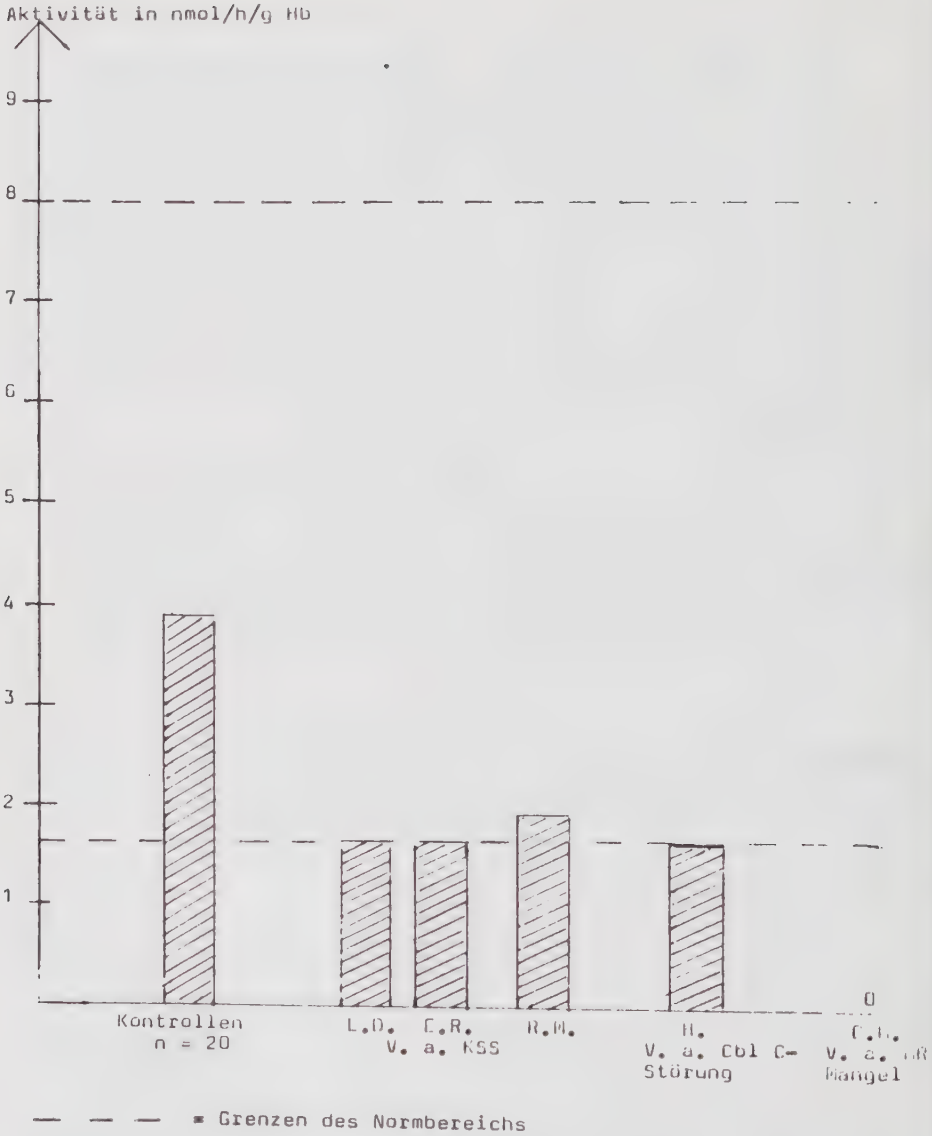
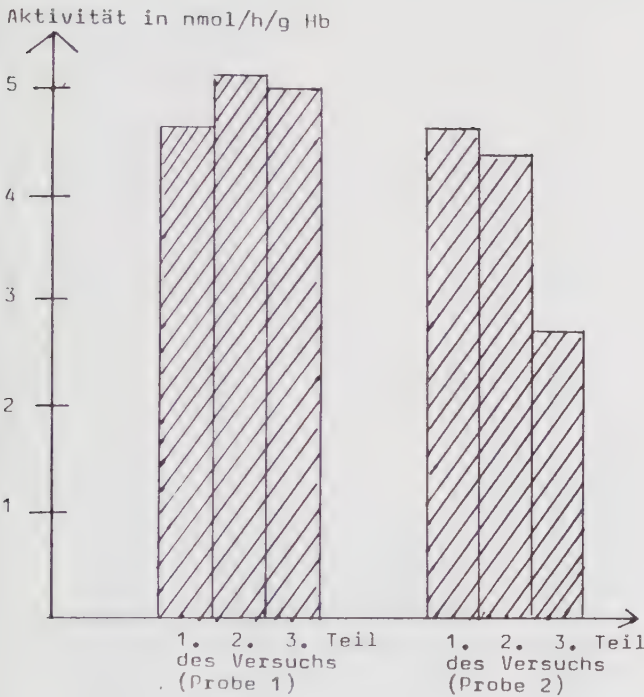


Abbildung 3: Die Aktivität der Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten



Teil 1: Verwendung frisch zubereiteter Erythrozyten

Teil 2: Verwendung eines einen Tag lang bei -20°C eingefrorenen Erythrozytenkonzentrats

Teil 3: Verwendung eines Erythrozytenkonzentrats, das einen Tag lang bei -20°C eingefroren war, dann 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend erneut bei -20°C eingefroren wurde

Abbildung 4: Messung der Stabilität der Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten

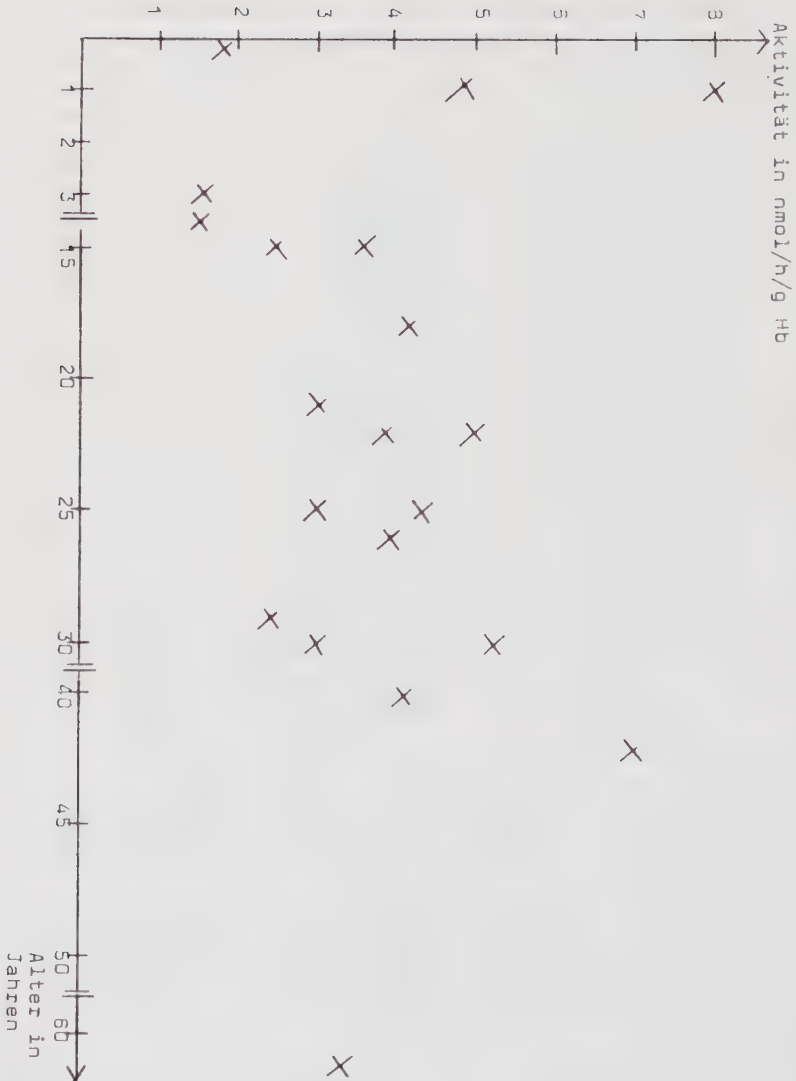


Abbildung 5: Abhängigkeit der Aktivität der Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten vom Alter der Patienten

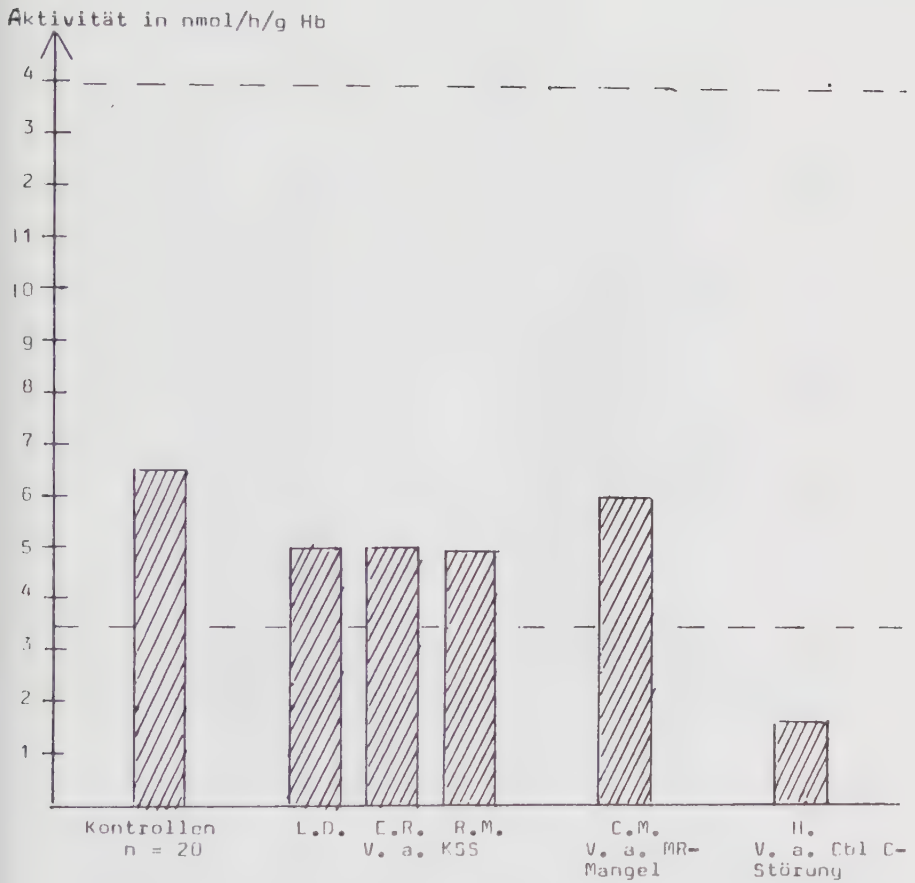
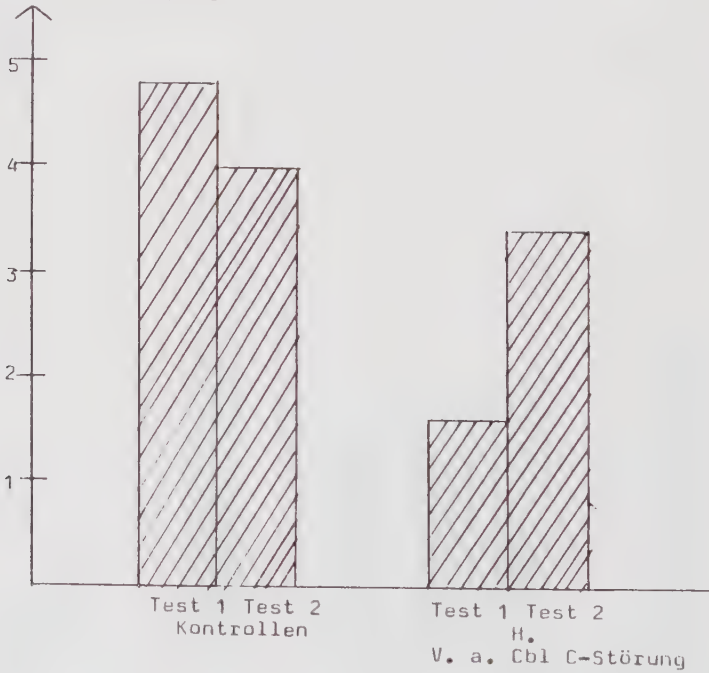


Abbildung 6: Die Aktivität der THF-Methyltransferase in Erythrozyten

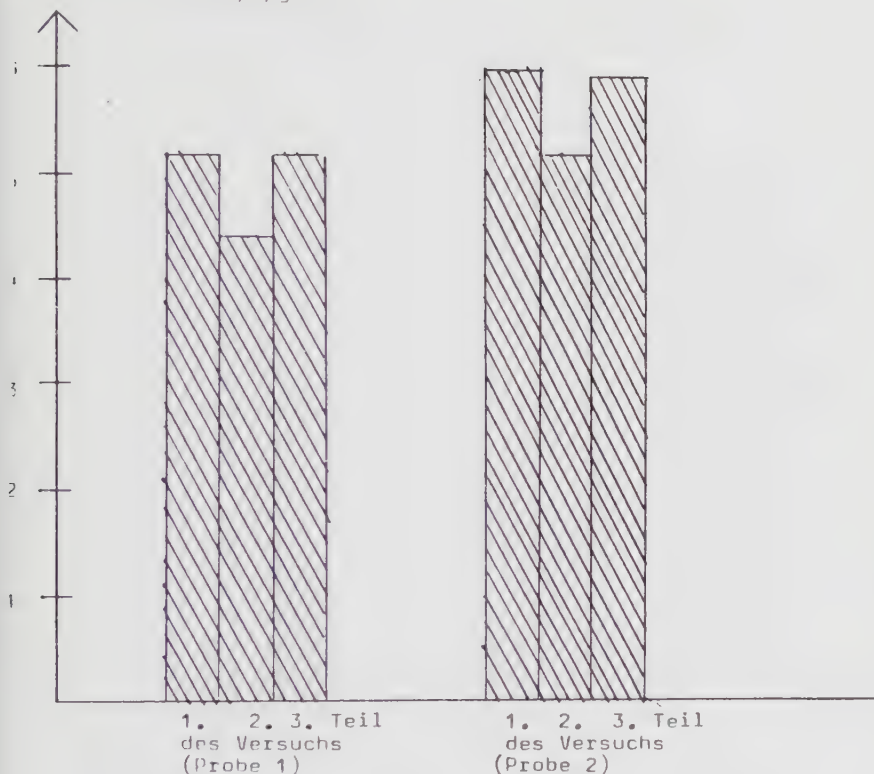
Aktivität in nmol/h/g Hb



Test 1: keine Änderung der Zusammensetzung des Reaktionsgemischs
Test 2: Verwendung von Methylcobalamin anstatt Vit B₁₂ im Reaktionsgemisch

Abbildung 7: Bestimmung der Aktivität der THF-Methyltransferase bei Verwendung von Methylcobalamin anstatt Vit B₁₂ im Reaktionsgemisch

Aktivität in nmol/h/g Hb



Teil 1: Verwendung frisch zubereiteter Erythrozyten

Teil 2: Verwendung eines einen Tag lang bei -20°C eingefrorenen Erythrozytenkonzentrats

Teil 3: Verwendung eines Erythrozytenkonzentrats, das einen Tag lang bei -20°C eingefroren war, dann 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend erneut bei -20°C eingefroren wurde

Abbildung 8: Messung der Stabilität der THF-Methyltransferase in Erythrozyten



Abbildung 9: Abhängigkeit der THF-Methyltransferase in Erythrozyten vom Alter

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Der Normbereich

Der Normbereich für das Enzym Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten umfaßt Werte zwischen 1,6 und 8,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb mit einer durchschnittlichen Aktivität von 3,9 nmol/h/g Hb (Tab. 1, Abb. 3), der für das Enzym THF-Methyltransferase Werte zwischen 3,4 und 14,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb mit einer durchschnittlichen Aktivität von 6,5 nmol/h/g Hb (Tab. 3, Abb. 6). Diese relativ niedrigen Werte lassen sich auf den im Vergleich zu proliferierenden Zellen verminderten Folsäuremetabolismus zurückführen. So konnten z.B. Taylor, Hanna und Hutton nachweisen, daß die Aktivität der Vit B₁₂-abhängigen THF-Methyltransferase in unreifen, sich schnell teilenden Knochenmarkszellen um ein Vielfaches höher liegt als in den reifen, sich nicht mehr teilenden Erythrozyten (44). Diese Aussagen decken sich mit den Untersuchungen von Sauer und Wilmanns, die festgestellt hatten, daß die Proliferationstendenz in menschlichen Lymphoblastenkulturen direkt mit der Höhe der Aktivität der THF-Methyltransferase korreliert. Je höher die Teilungsrate der Zellen ist, desto höher ist auch die Enzymaktivität (39).

Im Widerspruch zu den Ergebnissen stehen die Untersuchungen von Wagner und Levitch, die in ihren Tests keine nachweisbaren Aktivitäten von 5,10-Methylen-THF-Reduktase und THF-Methyltransferase in Erythrozyten feststellen konnten (46). Daraus entwickelten sie das Postulat, daß sich die Methyl-THF nicht im metabolischen Gleichgewicht mit anderen Folsäurederivaten befinde und in dieser inaktiven Form gleichsam "gefangen" sei. Nimmt man allerdings Modifikationen an den Versuchen nach Taylor und Weissbach bzw. nach Kutzbach und Stokstad bezüglich der Versuchsdauer, der verabreichten Menge an radioaktiv markierter Substanz etc. vor, so lassen sich Aktivitäten beider Enzyme ermitteln, die sich alle in einem bestimmten Bereich bewegen.

Die Anwesenheit einer Vit B₁₂-abhängigen THF-Methyltransferase in Erythrozyten ist außerdem schon von Taylor, Hanna und Hutton belegt worden (44).

2. Modifikationen des Tests

Führt man die Bestimmung der Aktivität der THF-Methyltransferase mit H₂O_{bide}st anstatt Vit B₁₂ durch, so resultiert daraus ein Aktivitätsverlust von 100 % (Tab. 4). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Taylor und Weissbach, die die Aktivität der THF-Methyltransferase in einem E. coli-Extrakt nach Weglassen von Vit B₁₂ untersuchten. Der Aktivitätsverlust betrug in diesem Fall 82 % (45). Eine Erklärung hierfür liefert die Tatsache, daß die Methyl-THF ihre Methylgruppe auf die Vit B₁₂ als prosthetische Gruppe enthaltende THF-Methyltransferase überträgt, um ein gebundenes Methyl-B₁₂-Intermediat zu bilden. Von dort wird dann die Methylgruppe auf Homozystein transferiert. Diese Reaktionsschritte können folglich bei Vit B₁₂-Mangel nicht mehr ablaufen. Ersetzt man im Reaktionsgemisch das Cyanocobalamin durch Methylcobalamin, so ergibt sich daraus keine größere Änderung der Aktivität der THF-Methyltransferase. Sie sinkt nur geringfügig von 4,8 auf 4,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb ab (Tab. 5, Abb. 7). Es können folglich beide Stoffe im Reaktionsgemisch verwendet werden, wenn eine Abspaltung der Cyanidgruppe und eine Reduktion des Cyanocobalamins gewährleistet ist. Weissbach et al. (47) haben bei Untersuchungen der Aktivität der THF-Methyltransferase im Lebergewebe beobachtet, daß bei Verwendung von Methylcobalamin im Reaktionsgemisch kein SAM, das unter Standardbedingungen die Methylgruppe des Methyl-THF auf das reduzierte Cobalamin übertragen soll, zur Durchführung des Versuchs notwendig ist. Daraus entwickelten sie die Theorie, daß entweder reduziertes Vit B₁₂ die Methylgruppe des exogen zugeführten Methylcobalamins aufnehmen kann, oder daß das reduzierte Cobalamin durch

Methylcobalamin auf dem Enzym ersetzt wird.

Läßt man im Versuch SAM weg und fügt statt dessen H_2O_2 hinzu, so führt dies zu einer Minderung der Aktivität der THF-Methyltransferase in den Erythrozyten von durchschnittlich 75 % (Tab. 4). Aus der Rolle von SAM beim Methylgruppentransfer müßte aber ein totaler Aktivitätsverlust resultieren. Die noch vorhandene Restaktivität könnte allerdings durch die sich im Erythrozytenlysat befindende Menge an SAM erklärt werden. Weniger wahrscheinlich ist, daß es sich bei der THF-Methyltransferase in den Erythrozyten um ein Enzym handelt, das den Transfer der Methylgruppe von Methyl-THF direkt auf das Cobalamin in Abwesenheit von SAM katalysiert, wie es Mangum und North bei Untersuchungen an der Schweineniere festgestellt haben (29). Dieser Möglichkeit steht die Tatsache entgegen, daß von Taylor, Hanna und Hutton bei Untersuchungen an Knochenmarkszellen, den Vorläufern der reifen Erythrozyten, eine absolute SAM-Abhängigkeit der THF-Methyltransferase nachgewiesen wurde. So verminderte sich die Aktivität im SAM-freien Gemisch bei ihnen auf etwa 10 % des Ausgangswertes (44).

Läßt man mit $FADH_2$ das reduzierende System im THF-Methyltransferase-Test weg, so führt dies zu einer Minderung der Aktivität des Enzyms von 86 % (Tab. 4). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Mangum und North überein, die in der Schweineniere einen ähnlichen Aktivitätsverlust bei vergleichbarem Versuchsaufbau ermittelten (29).

Die Enzyme Methylen-THF-Reduktase und THF-Methyltransferase wurden auf ihre Stabilität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. So wurden einmal frisch zubereitete Erythrozyten, einmal einen Tag lang bei $-20^{\circ}C$ eingefrorene Erythrozyten und einmal eingefrorene Erythrozyten, die einen Tag zuvor 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur aufgetaut worden waren, zu den Versuchen herangezogen. Bei der THF-Methyltransferase

führte dies zu Schwankungen von maximal 15 % (Tab. 6, Abb. 8). Diese Unterschiede sind so gering, daß man dem Enzym THF-Methyltransferase unter den gegebenen Bedingungen vollkommene Stabilität bescheinigen muß. Beim Enzym Methylen-THF-Reduktase liegt eine kompliziertere Situation vor. Während die Enzymaktivität in den Erythrozyten des einen Probanden unverändert blieb, ließ sich in den aufgetauten und dann nochmals eingefrorenen Erythrozyten des anderen Probanden ein Aktivitätsverlust von 40 % nachweisen (Tab. 2, Abb. 4). Deshalb muß unter den gegebenen Umständen die Stabilität der Methylen-THF-Reduktase nach zweimaligem Auftauen generell bezweifelt werden.

Trägt man die Werte für die THF-Methyltransferase und die Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten gegen das Alter der Probanden auf, so läßt sich ab dem 14. Lebensjahr keine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Alter feststellen (Abb. 5 und 9). Für Probanden unter 14 Jahren kann wegen der ungenügenden Anzahl von untersuchten Proben keine Aussage getroffen werden. Bei Untersuchungen des Lebergewebes durch Mudd et al. konnte z.B. eine Verminderung der Aktivität der THF-Methyltransferase und der Methylcobalaminkonzentration in den ersten 6 Lebensmonaten nachgewiesen werden (34).

3. Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom

Die Untersuchung der Enzymaktivität in den Erythrozyten der drei Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom erbrachte für die Methylen-THF-Reduktase die Werte 1,6, 1,6 bzw. 1,9 nmol Substratumsatz/h/g Hb, für die THF-Methyltransferase die Werte 5,0, 5,0 bzw. 6,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb (Tab. 1 und 3, Abb. 3 und 6). Damit liegen die Aktivitäten der beiden Enzyme in Erythrozyten im Normbereich. Während jedoch die Wer-

te für die THF-Methyltransferase nur geringfügig von der an Kontrollerythrozyten ermittelten, durchschnittlichen Enzymaktivität abweichen, sind die Werte für die Methylen-THF-Reduktase im unteren Normbereich angesiedelt. Allen et al. (1) kamen bei der Untersuchung der Methylen-THF-Reduktase in den Leukozyten einer Patientin mit Kearns-Sayre-Syndrom ebenfalls zu dem Ergebnis, daß sich die Enzymaktivität im Normbereich befinde. Allerdings stellten sie einen erniedrigten Gehalt des Muskels an freiem Carnitin und an mitochondrialen Enzymen, wie Cytochrom C-Oxidase, Carnitin-Palmityltransferase etc. fest. Diese Beobachtung konnten Dougados et al. an einer anderen Patientin nicht bestätigen (13). Bei beiden Patientinnen und einigen anderen konnte aber eine erniedrigte Konzentration an Folsäurederivaten im Liquor nachgewiesen werden (1,10,13,27). Der daraus resultierende Methyl-THF-Mangel könnte zu einer verminderten Aktivität der im Gehirn vorhandenen THF-Methyltransferase (42) führen, die über Methylierungsvorgänge die Myelinsynthese im Gehirn beeinflußt (13). Dies würde die im Rahmen des Kearns-Sayre-Syndroms auftretenden zerebralen Störungen erklären. Eine Ursache für den verminderten Folsäurespiegel des Liquors und die gleichzeitige Erniedrigung des Quotienten aus Liquor- und Serumfolsäurekonzentration könnte nach Untersuchungen von Macron et al. an einem Defekt des aktiven, energieabhängigen Transportsystems für Methyl-THF im Plexus choroideus liegen (27). Außerdem wurde über eine erhöhte Bindung von Folsäure an Proteine des Plexus choroideus spekuliert (1). Einen vollkommen anderen Gesichtspunkt zur Pathophysiologie des Kearns-Sayre-Syndroms brachten Kuriyama et al. ins Spiel. Sie stellten eine Erhöhung der Laktat- und Pyruvatkonzentration im Liquor fest. Deshalb schlossen sie auf eine Störung des Laktat-Pyruvat-Metabolismus im Gehirn als weitere mögliche Ursache des Kearns-Sayre-Syndroms (19). Diese Beobachtung ließ sich jedoch bisher nur an wenigen Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom verifizieren.

4. Patient mit einer Cobalamin C-Stoffwechselstörung

Die Aktivität der Methylen-THF-Reduktase beträgt bei dem Patienten mit Verdacht auf eine Cobalamin C-Stoffwechselstörung 1,6 nmol Substratumsatz/h/g Hb (Tab. 1, Abb. 3), die der THF-Methyltransferase ebenfalls 1,6 nmol Substratumsatz/h/g Hb (Tab. 3, Abb. 6). Während der Wert für die Methylen-THF-Reduktase gerade noch an der unteren Grenze des Normbereichs liegt, ist der Wert für die THF-Methyltransferase deutlich im pathologischen Bereich angesiedelt. Verwendet man allerdings Methylcobalamin im Versuchsansatz, so ergibt sich eine Steigerung der Aktivität der THF-Methyltransferase auf 3,4 nmol Substratumsatz/h/gHb (Tab. 5, Abb. 7), also an die Untergrenze des Normbereichs. Diese Aktivitätserhöhung legt den Verdacht auf eine Vit B₁₂-Stoffwechselstörung sehr nahe und widerspricht der Vermutung, daß es sich auch um einen Mangel an dem Apoenzym THF-Methyltransferase handeln könne. Ansonsten hätte das exogen zugeführte Methylcobalamin, das unter Umgehung des intrazellulären Cobalaminmetabolismus direkt als Cofaktor der THF-Methyltransferase fungieren kann, die Aktivität des Enzyms nicht stimulieren dürfen (47). Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen an Fibroblasten eines Patienten mit einer Cobalaminstoffwechselstörung. Im Lebergewebe konnte dieses Phänomen allerdings nicht nachvollzogen werden (5). In den letzten Jahren wurden etliche Untersuchungen zur Klärung der Ursache der auch bei dem oben angeführten Fall vermuteten Cobalamin C-Stoffwechselstörung vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, daß eine Beeinträchtigung der Endozytose des Trägerprotein-Cobalamin-Komplexes oder dessen intralysosomaler Spaltung ausgeschlossen werden kann. Da sowohl die Synthese von Methyl- als auch von Adenosylcobalamin sehr stark vermindert ist, muß der

Defekt eine Reaktion betreffen, die beiden Cobalaminderivaten gemeinsam ist. Diese kann nur am Anfang des intrazellulären Vit B₁₂-Metabolismus liegen. Mellman et al. vermuteten, daß es sich dabei um den Schritt direkt vor der Alkylierung des Cobalamins handle, in dem das trivalente Cobaltion reduziert wird. Sie nahmen deshalb einen "Cob-III-amin-Reduktase-Mangel" an (31). Als Folge dieses Defektes soll es zu einer verminderten Aktivität der THF-Methyltransferase und damit einer Anhäufung von Methyl-THF im Folsäurestoffwechsel kommen. Dieser Sachverhalt ist in der "Methyl-trap"-Theorie zusammengefaßt. Neuere Untersuchungen von Lumb et al. stellen allerdings diese Theorie als Erklärung für die Störung des Folsäuremetabolismus bei Vit B₁₂-Mangel in Frage. So konnten sie nachweisen, daß es im Lebergewebe der Ratten zu einem kurzen Anstieg und dann einem Abfall der Konzentration an 5-Methyl-THF-Polyglutamaten bzw. einer sofortigen Erniedrigung des 5-Methyl-THF-Monoglutamatspiegels kommt, wenn die Ratten zehn Tage lang ein Sauerstoff-Lachgas-Gemisch im Verhältnis 1 : 1 einatmen. Das Lachgas führt über eine Oxidation des Cob-I-alamins zur Inaktivierung der THF-Methyltransferase. Träfe die "Methyl-trap"-Theorie in diesem Fall zu, hätte ein konstanter, langsamer Anstieg der Methyl-THF-Konzentration aufgrund der "Blockierung" dieser Substanz im Stoffwechsel erfolgen müssen (26).

In den letzten Jahren wurden außerdem verstärkt Anstrengungen unternommen, das Gen für die THF-Methyltransferase im menschlichen Erbmateriale ausfindig zu machen. Mellman et al. gelang es, das Enzym einem Gen auf dem Chromosom 1 zuzuordnen (30).

5. Patient mit Methylen-THF-Reduktase-Mangel

Bei der Patientin mit Verdacht auf einen Methylen-THF-Reduktase-Mangel ließ sich keinerlei Aktivität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase in den Erythrozyten bestimmen, während die Aktivität des Enzyms THF-Methyltransferase einen Wert von 6,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb erreichte und damit in der Mitte des Normbereichs lag (Tab. 1 und 3, Abb. 3 und 6). Daraus ergibt sich, daß die bei der Patientin vermutete Störung des Folsäuremetabolismus tatsächlich vorliegt. Die Schwere ihrer Symptomatik bestätigt außerdem die Ergebnisse der Untersuchungen von Rosenblatt et al., die besagen, daß eine direkte Beziehung zwischen der Restenzymaktivität, der Ausprägung der klinischen Symptomatik und dem Anteil an Methyl-THF am intrazellulären Folatspiegel bestehe (38).

6. Schlußfolgerung

Die Bestimmung der Aktivität der Enzyme Methylen-THF-Reduktase und THF-Methyltransferase in den Erythrozyten stellt aufgrund der einfachen Durchführung der Versuche eine gute Möglichkeit eines Screening-Tests für Patienten mit Verdacht auf einen Methylen-THF-Reduktase-Mangel, einen THF-Methyltransferase-Mangel oder eine Cobalaminstoffwechselstörung dar. Allerdings erscheint es fraglich, ob damit Patienten, die für diese Störungen heterozygot sind, herausgefunden werden können, wie es Wong et al. mit Lymphozyten als Probenmaterial für die Bestimmung der Aktivität der Methylen-THF-Reduktase glauben zu können (49).

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Enzyme Methylen-THF-Reduktase und THF-Methyltransferase spielen im Folsäuremetabolismus eine wichtige Rolle. Bei einem Mangel des erstgenannten kommt es zu einer verminderten Bildung von Methyl-THF und damit zu einer Störung der Methylierungsvorgänge in Gehirn, Leber etc.. Neurologische Störungen, psychomotorische Retardierungen etc. sind die Folge. Liegt ein Mangel an THF-Methyltransferase vor, so führt dies laut der "Methyl-trap"-Hypothese zu einem Aufstau an Methyl-THF im menschlichen Körper. Dadurch wird ungenügend biologisch aktive THF für die Purin-, Pyrimidin-, Cholinbiosynthese etc. bereitgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob Defekte der Enzyme Methylen-THF-Reduktase und THF-Methyltransferase mit Hilfe der Messung ihrer Aktivität in Erythrozyten leichter festgestellt werden können.

Die Bestimmung der Aktivität der Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten erfolgte nach der Methode von Kutzbach und Stokstad, an der Modifikationen bezüglich der verabreichten Menge an radioaktivem Material etc. vorgenommen worden waren. Dabei ergab sich eine aus zwanzig Kontrollproben ermittelte, durchschnittliche Aktivität von $3,9 \pm 1,4$ nmol Substratumsatz/h/g Hb mit einem Normbereich von 1,6 bis 8,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb. Damit liegen die Werte deutlich unter denen von proliferierenden Zellen, wie z.B. Knochenmarkszellen. Bei einer Patientin mit V.a. Methylen-THF-Reduktase-Mangel ließ sich ein völliger Aktivitätsverlust nachweisen, bei drei Patienten mit V.a. Kearns-Sayre-Syndrom und einem Patienten mit V.a. eine Cobalamin C-Stoffwechselstörung lediglich eine grenzwertige Erniedrigung der Enzymaktivität.

Die Bestimmung der Aktivität der THF-Methyltransferase in Erythrozyten wurde nach der Methode von Taylor und Weiss-

bach durchgeführt, an der Modifikationen in Bezug auf die Versuchsdauer, die Menge der verabreichten radioaktiven Substanz etc. vorgenommen worden waren. Der Normbereich umfaßt Werte zwischen 3,4 und 14,0 nmol Substratumsatz/h/g Hb mit einer durchschnittlichen Aktivität von $6,5 \pm 3,0$ nmol/h/g Hb. Diese Werte wurden an zwanzig Kontrollproben ermittelt. Änderungen an der Zusammensetzung des Reaktionsgemischs ließen erkennen, daß für die Umwandlung von Methyl-THF in THF unter gleichzeitiger Bildung von Methionin aus Homozystein S-Adenosyl-L-Methionin, Vit B₁₂ als Cofaktoren des Enzyms und FADH₂ als Reduktionsmittel nötig sind. In ihrer Abwesenheit kam es zu Aktivitätsverlusten von 75 %, 100 % bzw. 86 %. Bei drei Patienten mit V.a. Kearns-Sayre-Syndrom und einer Patientin mit V.a. Methylen-THF-Reduktase-Mangel lag die Aktivität der THF-Methyltransferase im Normbereich mit geringer Abweichung von der durchschnittlichen Aktivität. Lediglich die Aktivität der THF-Methyltransferase des Patienten mit V.a. eine Cobalamin C-Stoffwechselstörung war deutlich im pathologischen Bereich angesiedelt. Bei der Verwendung von Methylcobalamin anstatt Cyanocobalamin im Reaktionsgemisch stieg die Aktivität signifikant auf einen grenzwertig normalen Wert an. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf einen gestörten intrazellulären Cobalaminmetabolismus bei gleichzeitig normaler Funktion des Enzyms THF-Methyltransferase. Bei der Überprüfung der Stabilität der Enzyme Methylen-THF-Reduktase und THF-Methyltransferase stellte sich heraus, daß einmaliges, kurzzeitiges Auftauen der Erythrozytenkonzentrate keinen deutlichen Aktivitätsverlust mit sich bringt. Selbst bei zweimaligem Auftauen war die THF-Methyltransferase stabil, während die Aktivität des Enzyms Methylen-THF-Reduktase in einem Fall auf 60 % des Ausgangswertes absank und in einem Fall unverändert blieb. Untersuchungen auf die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Alter der Patienten ließen erkennen,

daß sowohl bei der Methylen-THF-Reduktase als auch bei der THF-Methyltransferase nach dem 14. Lebensjahr keine altersbedingten Aktivitätsunterschiede auftraten. Bei Patienten bis zum Alter von 14 Jahren kann wegen mangelnder Kontrollproben keine Aussage gemacht werden.

Abschließend kann gesagt werden, daß die Messung der Aktivität der THF-Methyltransferase und der Methylen-THF-Reduktase in Erythrozyten mit den beschriebenen Verfahren eine entscheidende Vereinfachung der bisher vorhandenen Tests darstellt.

L I T E R A T U R N A C H W E I S

- (1) Allen R.J., DiMauro S., Coulter D.L., Papadimitriou A., Rothenberg S.P.: Kearns-Sayre Syndrome with Reduced Plasma and Cerebrospinal Fluid Folate. *Ann. Neurol.* 13: 679 (1983)
- (2) Allen R.J., Wong P., Rothenberg S.P., DiMauro S., Headington J.T.: Progressive Neonatal Leucoencephalomyopathy Due to Absent Methylenetetrahydrofolate Reductase, Responsive to Treatment. *Ann. Neurol.* 8: 211 (1980)
- (3) Ammon R., Dirscherl W.: Vitamin B₁₂ und verwandte Corinoide. Band III/2 der Reihe: Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme 1975
- (4) Ammon R., Dirscherl W.: Beziehungen der Hormone und Vitamine. Band III/3 der Reihe: Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehungen dieser Wirkstoffe zueinander. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme 1982
- (5) Baumgartner E.R., Wick H., Linnell J.C., Gauli G.E., Bachmann C., Steinmann B.: Congenital defect in intracellular cobalamin metabolism resulting in homocystinuria and methylmalonic aciduria. *Helv. paediat. Acta* 34: 483 (1979)
- (6) Bernsmaier A., Schrader A., Struppler A.: Differential-diagnose neurologischer Krankheitsbilder. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme 1984
- (7) Billings R.E., Noker P.E., Tephly T.R.: The Role of Methionine in Regulating Folate-Dependent Reactions in Isolated Rat Hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 208 No. 1: 108 (1981)
- (8) Buddecke E.: Grundriß der Biochemie. 6. Aufl. Berlin, New York: de Gruyter 1980

- (9) Carmel R., Bedros A.A., Mace J.W., Goodman S.I.:
Congenital Methylmalonic Aciduria - Homocystinuria
with Megaloblastic Anemia: Observations on Response
to Hydroxycobalamin and on the Effect of Homocysteine
and Methionine on the Deoxyuridine Suppression Test.
Blood 55: 570 (1980)
- (10) Coulter D.L., Allen R.J., DiMauro S., Rothenberg S.P.:
Kearns-Sayre Syndrome: a Possible Disorder of Folate
Metabolism. Ann. Neurol. 8: 22 (1980)
- (11) Dillon M.J., England J.M., Gompertz D., Goodey P.A.,
Grant D.B., Hussein H. A.-A., Linnell J.C., Matthews D.M.,
Mudd S.H., Newns G.H., Seakins J.W.T., Uhlendorf B.W.,
Wise I.J.: Mental Retardation, Megaloblastic Anemia,
Methylmalonic Aciduria and Abnormal Homocysteine
Metabolism Due to an Error in Vitamin B₁₂ Metabolism.
Clin. Sci. Mol. Med. 47: 43 (1974)
- (12) Donaldson K.O., Keresztesy J.C.: Naturally Occuring Forms
of Folic Acid. J. Biol. Chem. 237 No. 4: 1298 (1961)
- (13) Dougados M., Zittoun J., Laplane D., Castaigne P.:
Folate Metabolism Disorder in Kearns-Sayre Syndrome.
Ann. Neurol. 13: 687 (1983)
- (14) Freeman J.M., Finkelstein J.D., Mudd S.H.: Folate-
Responsive Homocystinuria and "Schizophrenia": A
Defect in Methylation Due to Deficient 5,10-Methylen-
tetrahydrofolate-Reductase Activity. N. Engl. J. Med.
292 No. 10: 491 (1975)
- (15) Kanwar Y.S., Manaligod J.R., Wong P.W.K.: Morphologic
Studies in a Patient with Homocystinuria Due to
5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency.
Pediat. Res. 10: 598 (1976)
- (16) Karlson P., Gerok W., Groß W.: Pathobiochemie. 2. Aufl.
Stuttgart, New York: Georg Thieme 1982

- (17) Katzen H.M., Buchanan J.M.: Enzymatic Synthesis of the Methyl Group of Methionine: VIII. Repression-Derepression, Purification, and Properties of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase from Escherichia Coli. J. Biol. Chem. 240 No. 2: 825 (1965)
- (18) Kaufman B.T., Donaldson K.O., Keresztesy J.C.: Chromatographic Separation of the Diastereoisomers of dl,L-5,10-Methyltetrahydrofolate. J. Biol. Chem. 238 No. 4: 1498 (1962)
- (19) Kuriyama M., Suehara M., Marume N., Osame M., Igata A.: High CSF lactate and pyruvate content in Kearns-Sayre syndrome. Neurology (Cleveland) 34: 253 (1984)
- (20) Kutzbach C., Stokstad E.L.R.: Mammalian Methylenetetrahydrofolate Reductase: Partial Purification, Properties, and Inhibition by S-Adenosylmethionine. Biochim. Biophys. Acta 250: 459 (1971)
- (21) Lehninger A.L.: Biochemie. 2. Aufl. Weinheim, New York: Verlag Chemie 1979
- (22) Leuthardt F.: Intermediärstoffwechsel. 1. Aufl. Berlin, New York: de Gruyter 1977
- (23) Levy H.L., Mudd S.H., Schulman J.D., Dreyfus P.M., Abeles R.H.: A Derangement in B₁₂ Metabolism Associated with Homocystinemia, Cystathioninemia, Hypomethioninemia and Methylmalonic Aciduria. Am. J. Med. 48: 390 (1970)
- (24) Linnell J.C., Matthews D.M., Mudd S.H., Uhlendorf B.W., Wise I.J.: Cobalamins in Fibroblasts Cultured from Normal Control Subjects and Patients with Methylmalonic Aciduria. Pediat. Res. 10: 179 (1976)
- (25) Löffler G., Petrides P.E., Weiss L., Harper H.A.: Physiologische Chemie. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1979

- (26) Lumb M., Deacon R., Perry J., Chanarin I., Minty B., Halsey M.J., Nunn J.F.: The Effect of Nitrous Inactivation of Vitamin B₁₂ on Rat Hepatic Folate. *Biochem. J.* 186: 933 (1980)
- (27) Macron J.M., Mizon J.P., Rosa A.: Troubles du Métabolisme des Folates au Cours d'un Syndrome de Kearns et Sayre. *Rev. Neurol. (Paris)* 139 No. 11: 673 (1983)
- (28) Mahoney M.J., Rosenberg L.E.: Defective Metabolism of Vit B₁₂ in Fibroblasts from Children with Methylmalonic Aciduria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44, No. 2: 375 (1971)
- (29) Mangum H., North J.A.: Isolation of Cobalamin Containing 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Transmethylase from Mammalian Kidney. *Biochemistry* 10 No. 20: 3765 (1971)
- (30) Mellman I.S., Lin P.F., Ruddle F.H., Rosenberg L.E.: Genetic control of cobalamin binding in normal and mutant cells: Assignment of the gene for 5-methyltetrahydrofolate: L-homocysteine 5-methyltransferase to human chromosome 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 No. 1: 405 (1979)
- (31) Mellman I.S., Willard H.F., Youngdahl-Turner P., Rosenberg L.E.: Cobalamin Coenzyme Synthesis in Normal and Mutant Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254: 11847 (1979)
- (32) Mudd S.H., Freeman J.M.: Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency and Schizophrenia: A Working Hypothesis. *J. Psychiat. Res.* 11: 259 (1974)
- (33) Mudd S.H., Levy H.L., Abeles R.H.: A Derangement in B₁₂ Metabolism Leading to Homocystinemia, Cystathionemia, and Methylmalonic Aciduria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35 No. 1: 121 (1969)

- (34) Mudd S.H., Levy H.L., Morrow G.: Deranged B₁₂ Metabolism: Effect on Sulfur Amino Acid Metabolism. *Biochem Med.* 4: 193 (1970)
- (35) Mudd S.H., Uhlenendorf B.W., Freeman J.M.: Homocystinuria Associated with Decreased Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46 No. 2: 905 (1972)
- (36) Narisawa K., Wada Y., Saito T.: Infantile Type of Homocystinuria with Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Tohoku J. Exp. Med.* 121: 185 (1977)
- (37) Pearson A.G.M., Turner A.J.: Folate-dependent 1-carbon transfer to biogenic amines mediated by methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature* 258 No. 5531: 173 (1975)
- (38) Rosenblatt D.S., Cooper B., Lue-Shing S., Wong P., Berlow S., Narisawa K., Baumgartner R.: Folate Distribution in Cultured Human Cells. *J. Clin. Invest.* 63: 1019 (1979)
- (39) Sauer H., Wilmanns W.: The Activity of the Cobalamine-dependent Methionine-Synthetase (5-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydrofolic Acid: Homocysteine Methyltransferase) in Rapidly Growing Human Cells and the Effect of Some Folic Acid Derivatives and Analogues: In Pfeleiderer W.: *Chemistry and Biology of Pteridines*. Berlin, New York: de Gruyter 1976
- (40) Scheid W.: *Lehrbuch der Neurologie*. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme 1983
- (41) Shin Y.S., Buehring K.U., Stokstad E.L.R.: Studies of folate compounds in nature: Folate compounds in rat kidney and red blood cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 163: 211 (1974)
- (42) Spector R., Coakley G., Blakely R.: Methionine Recycling in Brain: A Role for Folates and Vitamin B₁₂. *J. Neurochem.* 34 No. 1: 132 (1980)

- (43) Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S.: The Metabolic Basis of Inherited Disease. 5. Aufl. New York: Mc Graw-Hill Book Company 1983
- (44) Taylor R.T., Hanna M.L., Hutton J.J.: 5-Methyltetrahydrofolate Homocysteine Cobalamin Methyltransferase in Human Bone Marrow and its Relationship to Pernicious Anemia. Arch. Biochem. Biophys. 165: 787 (1974)
- (45) Taylor R.T., Weissbach H.: N⁵-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Transmethylase: Partial Purification and Properties. J. Biol. Chem. 242 No. 7: 1502 (1967)
- (46) Wagner C., Levitch M.W.: The Utilization of Formate by Human Erythrocytes. Biochem. Biophys. Acta 304: 623 (1973)
- (47) Weissbach H., Peterkofsky A., Redfield B.G., Dickerman H.: Studies on the Terminal Reaction in the Biosynthesis of Methionine. J. Biol. Chem. 238 No. 10: 3318 (1963)
- (48) Wong P.W., Justice P., Hruby M.: Nonresponsive Homozygotes and Heterozygotes with Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. Pediatrics 59 No. 5: 749 (1977)
- (49) Wong P.W., Justice P., Berlow S.: Detection of Homozygotes and Heterozygotes with Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. J. Lab. Clin. Med. 90 No. 2: 283 (1977)

LEBENS L A U F

Name: Betz

Vornamen: Edgar Heinz

Geboren: 11. 6. 1959

Konfession: römisch-katholisch

Eltern: Heinz Betz, Werkzeugmacher, und Annemarie Betz, geb.
Stelzle, Verwaltungsangestellte,

Schulen: Grundschule in Günzburg von 1965 bis 1969

Gymnasium in Günzburg von 1969 bis 1978

Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am 29. 6. 1978

Grundwehrdienst vom 1. 7. 1978 bis zum 30. 4. 1979
vom 1. 9. 1985 bis zum 31. 1. 1986

Studium der Medizin vom 1. 5. 1979 bis zum 30. 4. 1985 an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München

Examina: Ärztliche Vorprüfung am 24. 3. 1981

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 25. 3. 1982

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 20. 3. 1984

3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 30. 4. 1985

1984/85 Praktisches Jahr: Pädiatrie in der Dr. von Haunerschen
Kinderklinik, München, Innere Medizin in der 3. Med. des Zentral-
klinikums Augsburg, Chirurgie am Zentralklinikum Augsburg

